

QUALITATIVE DETERMINATION OF SPERMIDINE AND PUTRESCINE

Patent Number: JP55141199

Publication date: 1980-11-04

Inventor(s): OKADA MASATO

Applicant(s): TOKUYAMA SODA CO LTD

Requested Patent: JP55141199

Application Number: JP19790047183 19790419

Priority Number(s):

IPC Classification: C12Q1/32; C12Q1/26; G01N33/52

EC Classification:

Equivalents: JP1397005C, JP62004119B

-

Abstract

PURPOSE: To determine spermidine with good reproducibility quickly and easily, by reacting a spermidine-containing solution with spermidine dehydrogenase in the presence of an electron acceptor.

CONSTITUTION: A spermidine-containing solution, e.g., the human urine, an extracted solution of the human organization, is reacted usually with 0.1-5.0 enzyme units of spermidine dehydrogenase in the presence of an electron acceptor, e.g., potassium ferricyanide. A SH group-containing compound (e.g., beta-mercaptoethanol) is then added to the reaction solution to reduce the excess electron acceptor so that the reaction solution becomes colorless. Prepared 1-pyrroline shown by the formula 1 is submitted to colorimetry to determine spermidine. By using this determination of spermidine, a solution containing both spermidine and putrescine can be analyzed quantitatively to determine putrescine with good reproducibility quickly and easily.

Data supplied from the **esp@cenet** database - 12

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-141199

⑤ Int. Cl.³
C 12 Q 1/32
1/26
G 01 N 33/52

識別記号

庁内整理番号
7349-4B
7349-4B
6514-2G

④ 公開 昭和55年(1980)11月4日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑭ スペルミジンおよびブトレシンの定量方法

徳山市御影町1番1号徳山曹達
株式会社内

⑯ 特 願 昭54-47183

⑰ 出 願 人 徳山曹達株式会社

⑱ 出 願 昭54(1979)4月19日

徳山市御影町1番1号

⑲ 発 明 者 岡田昌人

明 細 書

1. 発明の名称 スペルミジンおよびブトレシンの
定量方法

2. 特許請求の範囲

- (1) スペルミジン含有溶液に電子受容体の存在下スペルミジンデヒドログナーゼを作用させ、次いで該溶液に8日基を有する化合物を添加した後、該溶液中のノビロリンを比色分析することを特徴とするスペルミジンの定量方法。
- (2) スペルミジンおよびブトレシンを含有するポリアミン溶液からブトレシンをそれぞれ定量するに際し、該ポリアミン溶液の一部に電子受容体の存在下スペルミジンデヒドログナーゼを作用させ、次いで該溶液に8日基を有する化合物を添加した後、該溶液中のノビロリンを比色分析することによりスペルミジンの量(A)を求め、またポリアミン溶液他の一部にブトレシンオキシダーゼを作用させた後該溶液中のノビロリンまたは過酸化水素を

比色分析してスペルミジンおよびブトレシンのトータル値(X)を求めて、X-Aよりブトレシンの量を求めることを特徴とするブトレシンの定量方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はスペルミジンおよびブトレシンの簡便な定量方法に関する。詳しくは、スペルミジンを含む溶液からスペルミジンを、またスペルミジンとブトレシンを含むポリアミン溶液からブトレシンを簡便な操作で正確に定量する方法に関する。

スペルミジンあるいはブトレシンのようなポリアミンは生体中に存在するが、生体中でポリアミンは細胞増殖に関与しており、その濃度は核酸合成に先行して上昇する。1971年ラッセル等の研究〔キャンサー・リサーチ3/巻1555~1558(1971)〕により、癌患者の尿中のポリアミンの濃度は健康人と比較して上昇していることが明らかにされて以来、ポリアミンは癌との相関から注目を浴びる様になつた。それ以後、癌とポリアミンの相関性の多くの研究者によつて

調べられ、ラッセル等の研究の妥当性が確かめられた。〔例えば、クリニカル・ケミストリー 23 巻 22~27 (1977) 参照〕。

したがって必要上、これまでに多くの研究者によつて生体中のポリアミンの定量がなされているが、いずれも煩雑で労力を要するのみならず、分析定量に時間を要する。現在のところ再現性、感度の点で最も信頼性のあるポリアミンの定量法は高速液体クロマトグラフィーによる方法である。しかしながらこの方法においても、1検体の分析処理に約60分を要し、研究レベルでの方法としての域を脱しきれない。

最近、ポリアミンの迅速且つ簡便な定量法として酵素法が注目されている。例えば、スベルミジンの定量はセラチア・マルセセンスの凍結乾燥菌体による菌体反応による方法〔ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー 23 巻 2098 (1963)〕で行われるが、この方法においては菌体中の他の成分による酵素反応の阻害等の影響が不明であり、また菌体中のスベルミジン等のポリアミンの酵素

反応に及ぼす影響が不明である。さらに検出感度が $0.05 \mu\text{mol}$ 以上と低いという欠点を有している。

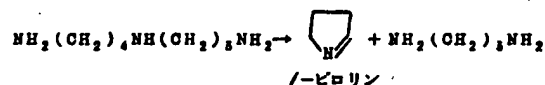
本発明は、酵素法によるスベルミジンの定量方法に関するものであり、スベルミジンデヒドログナーゼを用いて迅速、簡便に、且つ再現性良く定量する方法を提供する。尚、スベルミジンデヒドログナーゼはセラチア・マルセセンスなる細菌から見出された酵素である。即ち本発明は、スベルミジン含有溶液に電子受容体の存在下、スベルミジンデヒドログナーゼを作用させ、次いで該溶液に日基を有する化合物を添加した後、該溶液中のノーピロリンを比色定量することを特徴とするスベルミジンの定量方法である。

本発明において定量の対象となるスベルミジンを含む溶液としては、例えば人体の尿、組織抽出液等が挙げられる。

以下に本発明を詳述するが、好適な例として人体の尿を用いて説明する。人体の尿にはスベルミジンの他プトレシン、スベルミン等のポリアミン

3

が含まれているので以下ポリアミン溶液と称する。本発明においては、先ずポリアミン溶液に予め電子受容体の存在下でスベルミジンデヒドログナーゼを作用させることが必要である。電子受容体としてはフェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェート、p-クロロフェノールインドフェノール等が用いられ、好ましくは、フェリシアン化カリウムが酵素反応速度が早い点で有利に使用される。電子受容体の添加量は一般に最終濃度が $0.5 \sim 2$ ミリモルとなるように添加すればよい。またスベルミジンデヒドログナーゼは一般に $0.1 \sim 5.0$ 酵素単位加え、 $10 \sim 40^\circ\text{C}$ で $0.5 \sim 5$ 時間反応を行わせる。かくしてポリアミン溶液中のスベルミジンは、次のように反応して



ノーピロリンが生成される。

したがって、この生成したノーピロリンを比色分析することによつて当初のポリアミン溶液中の

4

スベルミジンの量を求めることができる。しかしながら実際的には、反応溶液中に過剰に存在する電子受容体の潜色によりノーピロリンの比色分析が妨害されるために、ひいてはポリアミン溶液中のスベルミジンの量を求めることが不可能である。

本発明においては上記ノーピロリンの比色分析に先だつて反応溶液に日基を有する化合物を添加して過剰の電子受容体を還元せしめて無色にすることが、ノーピロリンを正確に比色分析するために極めて重要な特徴である。即ち、反応溶液に添加される日基を有する化合物は過剰の電子受容体を還元するのみでノーピロリンに対してもまた比色定数に対しても何等の影響を及ぼさない。かかる日基を有する化合物としては、 β -メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、システイン等があげられるが、好ましくは β -メルカプトエタノール、ジチオスレイトールが還元力の点で有利に使用できる。

ノーピロリンの定量はO-アミノベンズアルデヒドとの非酵素的反応により生成する2,3-トリ

メチレン-1,2-ジハイドロキナゾリウムを435 nmにて比色分析する。この方法はジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー238巻2098 (1963) に記載されている。他方、ポリアミン溶液にスベルミジンデヒドロゲナーゼを作用させる代りに水を用いた以外は前記と全く同一の条件、操作を行つて比色分析を行う。かくして両者の比色定量の結果、吸光度の差からポリアミン溶液中のスベルミジンの量が算出される。

本発明においては上記したスベルミジンの定量方法を利用して、更にスベルミジンおよびブトレシンの含有されているポリアミン溶液からブトレシンを迅速、簡便且つ再現性良く定量する方法が提供される。

従来知られているブトレシンの酵素法による定量は、8-アデノシル-L-メチオニン脱炭酸酵素による〔1-¹⁴C〕8-アデノシルメチオニンの脱炭酸反応のブトレシンによる活性化を利用し、生成する¹⁴CO₂の検出による方法〔バイオヒミカ・バイオフィジカ・アクタ、304巻753 (1973)〕

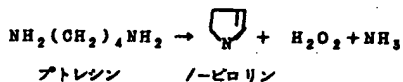
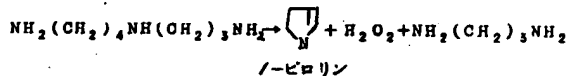
7

ブトレシンのトータル量(X)を求めて、X-Aブトレシンの量を求めることを特徴とするブトレシンの定量方法である。

生体中でスベルミジンとブトレシンのうち、どちらが生理的に重要な役割を果たしているかは未だ明確ではない。例えば、ガン患者の体液中に、スベルミジンとブトレシンのどちらが健康人のそれに比較して多くなっているかは論議されている段階である。しかるに、スベルミジンとブトレシンをそれぞれ定量することは非常に意義深いことである。

本発明においてポリアミン溶液のスベルミジンとブトレシンを定量するためには、該ポリアミン溶液にブトレシンオキシダーゼを作用させることが必要である。尚、ブトレシンオキシダーゼはミクロコッカス・ルーベンスなる細菌から見出された酵素である。ブトレシンオキシダーゼはポリアミン溶液に一般に0.1〜5.0酵素単位加えられ、10〜40℃で0.5〜5.0時間反応させる。かくして、ポリアミン溶液中のスベルミジンおよびブ

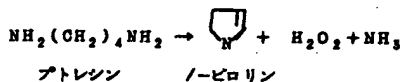
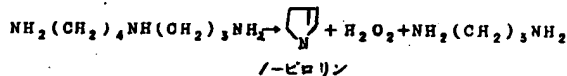
トレシンは次のように反応する。



尚、人体の尿には他のポリアミンとしてスベルミンも含まれているが、ブトレシンオキシダーゼは、スベルミンには作用しない。したがって、反応溶液中の生成したノ-ピロリンまたは過酸化水素を比色分析することによつて、当初のポリアミン溶液中のスベルミジンとブトレシンを定量することができる。なお過酸化水素の定量は該過酸化水素をパーオキシダーゼ存在下で0-ジアニジンを酸化し、その酸化型0-ジアニジンを440 nmの波長で比色分析して定量される。しかしながら過酸化水素の定量はノ-ピロリンのそれと比べ感度は約5倍位高いが、定量の再現性及び簡便さから言えばノ-ピロリンの定量の方が有利である。

8

ブトレシンは次のように反応する。



尚、人体の尿には他のポリアミンとしてスベルミンも含まれているが、ブトレシンオキシダーゼは、スベルミンには作用しない。したがって、反応溶液中の生成したノ-ピロリンまたは過酸化水素を比色分析することによつて、当初のポリアミン溶液中のスベルミジンとブトレシンを定量することができる。なお過酸化水素の定量は該過酸化水素をパーオキシダーゼ存在下で0-ジアニジンを酸化し、その酸化型0-ジアニジンを440 nmの波長で比色分析して定量される。しかしながら過酸化水素の定量はノ-ピロリンのそれと比べ感度は約5倍位高いが、定量の再現性及び簡便さから言えばノ-ピロリンの定量の方が有利である。

以上の結果から X-A によつてフトレシンの量が算出される。

以下、本発明のスベルミジンおよびフトレシンの定量方法を実施する代表的な操作手順によつて説明する。本発明はこれに限られるものではなく、用いる試薬その量等は適宜の変更および応用が加えられることは言うまでもない。

(1) スベルミジンの定量

- ① ポリアミン水溶液サンプル 0.1 ml
- ② 緩衝液: 0.1 mole リン酸、2 mmole フェリ (pH 7.2) シアン化カリウム
- ③ O-アミノベンズアルデヒド: 0.1 % (W/V) 水溶液 0.1 ml
- ④ スベルミジンデヒドロゲナーゼ: 1.0 unit、比活性 350 0.01 ml
- ⑤ β-メルカプトエタノール: 0.5 % (V/V) 水溶液 0.1 ml

上記試薬①～④を試験管に入れ、30分間37℃で振とうして反応させる。反応後⑤のβ-メルカプトエタノール水溶液を加え、37℃30分間

11

表 1

定量結果	スベルミジン (μmole)	ΔOD	ポリアミン水溶液 (実濃度)	
			スベルミジン (μmole)	フトレシンの (μmole)
	0.0046	0.012	0.005	0.005
	0.0073	0.019	0.010	0.010
	0.015	0.040	0.020	0.020
	0.024	0.063	0.030	0.030
	0.033	0.086	0.040	0.040
	0.043	0.111	0.050	0.050
	0.091	0.235	0.100	0.100

13

特開昭55-141199(4)

振とうする。他方、比較として④の酵素水溶液の代わりに水を用いたものを同様に処理する。各処理液435nmの吸光度を測定し、その差をΔODとする。尚、3-トリメチレン-1,2-ジハイドロキナゾリウムの分子吸光係数は、 $2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と報告されている(ジャーナル・バイオリジカル・ケミストリー234巻2/45(1959))

このΔODからスベルミジン含量(A)は、次のようにして計算される。

$$A = \Delta OD \cdot \frac{0.81}{2.1} (\mu \text{mole})$$

本発明の定量方法について、その正確性および実用性を確かめる目的で既知量のスベルミジンとフトレシンを含有するポリアミン溶液を用いて定量を行つた。結果は、第1表の通りであつた。

12

以上の結果から定量値が実験値と誤差範囲内で良く一致していることがわかる。

(2) スベルミジンとフトレシンのトータル量の定量

- ① ポリアミン水溶液サンプル: 0.1 ml
- ② 緩衝液: 0.1 mole リン酸緩衝液 (pH 7.2) 0.5 ml
- ③ O-アミノベンズアルデヒド: 0.1 % (W/V) 水溶液 0.1 ml
- ④ フトレシンオキシダーゼ: 1.0 unit 比活性 30 0.04 ml

上記試薬①～④を試験管に入れ、5分間37℃で振とうする。次いで④の酵素液を加え、37℃で2時間振とうして反応させる。比較として④の酵素溶液の代わりに水を用いたものを同様に処理する。各処理液435nmの吸光度を測定し、その差をΔODとする。ΔODからスベルミジンとフトレシンのトータル量(X)は次のようにして計算される。

$$X = \Delta OD \cdot \frac{0.74}{2.1} (\mu \text{mole})$$

14

ポリアミン水溶液として種々の既知濃度のスベルミジンとブトレシンを含有する溶液を使って、本発明の定量方法について正確性と実用性を検討した。結果は第2表に示す通りであつた。

第 2 表

ポリアミン水溶液 (実験用)	定量結果 スベルミジン+ブトレシン (μmole)		ΔOD
	スベルミジン (μmole)	ブトレシン (μmole)	
0.005	0.005	0.005	0.029
0.010	0.010	0.010	0.059
0.020	0.020	0.020	0.117
0.030	0.030	0.030	0.174
0.040	0.040	0.040	0.232
0.050	0.050	0.050	0.296
0.100	0.100	0.100	0.564

15

以上の結果から定量値が実験値と誤差範囲内で良く一致していることがわかる。

(3) ブトレシンの含量

(1) で得られたスベルミジンの量……A

(2) で得られたスベルミジンとブトレシンのトータル量……X

とすれば、ブトレシン含量(B)は次の式から算出される。

$$B = X - A \quad (\mu\text{mole})$$

実施例1

(1) ブトレシンとスベルミジンのトータル量の定量

(1) 用いる試薬

- (1) 被検液 ポリアミン含有水溶液 (ブトレシン、スベルミジン含有量未知) 0.1 ml
 (2) 緩衝液 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 0.5 ml
 (3) 0.1 % (W/V) O-アミノベンズアルデヒド水溶液 0.1 ml
 (4) ブトレシンオキシダーゼ (1.0 unit、比活性 30) 0.04 ml

(2) 操 作

16

上記試薬 (1) - (4) を試験管に入れ、5 分間 37°C でよく振とうする。次いで酵素液を加えた後、37°C で 2 時間振とう反応させる。一万、コントロールとして酵素溶液の代わりに水を入れたものを同様に処理する。被検液の 435 nm での吸光度を求め、コントロールとの差、 ΔOD は 0.350 であつた。計算に依つて被検液中のブトレシンとスベルミジン含量は、0.123 μmole と分析された。

(2) スベルミジン量の定量

(1) 用いる試薬

- (1) 被検液 ポリアミン含有水溶液 (ブトレシン、スベルミジン含有量未知) 0.1 ml
 (2) 緩衝液: 0.1 M リン酸、2 mM フェリシアニ化カリウム (pH 7.2) 0.5 ml
 (3) O-アミノベンズアルデヒド: 0.1 % 水溶液 0.1 ml
 (4) スベルミジンデヒドロゲナーゼ: 1.0 unit 比活性 350 0.01 ml
 (5) β -メルカプトエタノール: 0.5 % (V/V)

17

-549-

18

水溶液

0.1 ml

(4) 操 作

上記試薬(1)～(4)を試験管に入れ、37℃で30分間振とうし反応させる。反応後(5)のβ-メルカプトエタノール水溶液を加え、37℃で30分間振とうする。コントロールとして(1)の酵素溶液の代わりに水を入れたものを同様に処理する。被検液の435nmでの吸光度を求め、コントロールとの差 ΔOD は0.185であつた。計算から被検液中のスベルミジン量は0.071 μmole である。さらに第1図の検査線より実スベルミジン量は0.079 μmole と分析された。

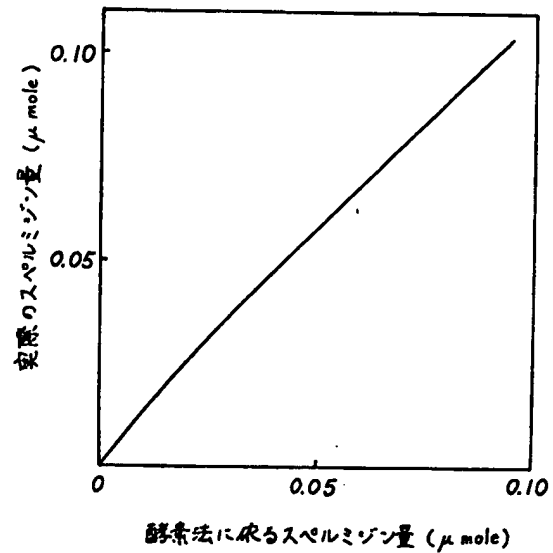
(4) フトレシン量の算出

従つて被検液中のフトレシン量は0.123 - 0.079 = 0.044 μmole と計算される。

4 図面の簡単な説明

第1図はスベルミジン量の検査線を示す。

第1図



特許出願人 徳山曹達株式会社